

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian dimana peneliti dapat melakukan pengawasan (kontrol) terhadap variable bebas baik sebelum penelitian maupun selama penelitian sehingga dapat meminimalkan pengaruh komponen lain yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Peneliti mampu untuk memanipulasi variable bebas dan mengatur situasi penelitian sehingga dapat menjelaskan faktor-faktor sebab dan akibat (Yusuf, 2014).

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana rancangan ini digunakan untuk kondisi bahan percobaan dan faktor lingkungan bersifat homogeny (Nurhatika, 2010).

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri selulolitik R4-3 yang terdapat pada saluran pencernaan rayap *Cryptotermes* sp. yang diambil dari *furnitur* kursi kayu. Selanjutnya sampel penelitian yang digunakan adalah enzim yang diproduksi oleh isolat bakteri selulolitik R4-3 yang diperoleh dari saluran pencernaan rayap *Cryptotermes* sp.

3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan Februari 2019 sampai dengan Juli 2019 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Biologi Universitas Pendidikan Indonesia di Jalan Dr. Setiabudi No. 299 Bandung.

3.5 Alat dan Bahan

Penelitian ini memerlukan alat dan bahan untuk isolasi bakteri dari saluran pencernaan rayap *Cryptotermes*, seleksi bakteri selulolitik, penentuan dan identifikasi spesies bakteri selulolitik, pembuatan substrat serbuk jerami padi, produksi enzim secara *Submerged Fermentation* (SmF) dan optimasi produksi enzim selulase. Alat dan bahan tersedia di Laboratorium Riset, Gedung B Fakultas Pendidikan Matematika dan IPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Tabel alat dan bahan yang digunakan terlampir pada Lampiran-1.

3.6 Prosedur Penelitian

Terdapat beberapa tahap yang dilakukan dalam penelitian untuk mencapai hasil yang diinginkan. Tahap pertama yang dilakukan adalah isolasi bakteri dari saluran pencernaan rayap *Cryptotermes*, setelah itu dibuat biakan campuran dan dipilih koloni bakteri yang berbeda dari setiap pengulangan. Tahap kedua seleksi bakteri selulolitik dilakukan menggunakan medium CMC 1% dan dipilih lima bakteri terbaik berdasarkan indeks selulolitik terbesar, setelah didapatkan bakteri selulolitik dengan indeks selulolitik terbesar, dilakukan identifikasi spesies secara morfologi, biokimia dan merujuk pada buku Bergey's Manual Systematic Determination. Tahap ketiga dalam pembuatan substrat serbuk jerami padi dilakukan tahap delignifikasi secara mekanik dengan memperkecil partikel jerami padi hingga ukuran 100 mesh dan dilakukan delignifikasi menggunakan larutan basa dan asam. Tahap ke-empat produksi enzim secara *Submerged Fermentation* (SmF) dilakukan dengan optimasi produksi enzim selulase berdasarkan perbedaan suhu dan pH medium. Penentuan optimasi aktivitas enzim berdasarkan aktivitas enzim yang diukur menggunakan reagen DNS dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

3.5.1 Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan ini meliputi persiapan alat dan bahan yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi sebelum digunakan dalam penelitian. Alat yang akan disterilasi dibungkus oleh kertas agar tetap kering kemudian dimasukkan kedalam plastik dan untuk bahan yang perlu disterilasi dimasukkan kedalam wadah kaca bersih, kemudian diberi sumbat serta bungkus plastik. Setelah proses pembungkusan alat dan bahan yang akan disterilasi selesai, kemudian dimasukkan kedalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi (Shahid *et al.*, 2016). Pembuatan reagen dan media yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Lampiran-2. Kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Riset Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.5.2 Pengambilan Sampel

Rayap diambil dari potongan kayu dan ditempatkan pada cawan Petri steril. Setelah itu, permukaan tubuh rayap dibersihkan dengan alkohol 70%. Dilakukan pemisahan terhadap 15 ekor tubuh dan kepala rayap, kemudian tubuh rayap dihancurkan menggunakan batang kaca (Upadhyaya *et al.*, 2014). Tubuh rayap dihancurkan pada larutan salin 0,9% dibawah kondisi steril (Gupta *et al.*, 2012). Ekstrak tubuh rayap akan digunakan untuk isolasi bakteri.

3.5.3 Isolasi Bakteri

Dalam melakukan isolasi bakteri, digunakan metode pengenceran cawan tuang. Prinsip dari metode ini adalah pengenceran organisme sehingga individu spesies dapat dipisahkan dari spesies lainnya. Digunakan pengenceran bertingkat sebanyak enam kali, dimasukkan sebanyak 1 mL suspensi hasil ekstrak saluran pencernaan rayap kedalam tabung berisi 9 mL akuades steril, kemudian dihomogenkan dengan cara divorteks hingga didapatkan pengenceran pertama, tahapan ini dilakukan hingga tingkatan pengenceran ke-6. Setelah didapatkan enam tabung dengan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} , secara aseptik sebanyak 0,1 mL

hasil pengenceran pada masing-masing tabung kedalam enam cawan petri steril berisi medium NA (*Nutrient Agar*) (Hadioetomo, 1990). Biakan bakteri campuran yang telah tumbuh pada medium NA, dilakukan isolasi biakan murni pada medium NA miring.

3.5.4 Pembiakan Isolat Bakteri

Digunakan tiga media untuk inokulasi bakteri, diantaranya :

1) NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Nutrient Agar (NA) dan *Nutrient Broth* (NB) digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme umum. Media ini menyediakan nutrisi umum yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme seperti sebagai sumber karbohidrat, senyawa nitrogen organik atau vitamin (Tankeshwar, 2016).

2) CMC (*Carboxymethylcellulose*) Agar

Media CMC Agar digunakan sebagai media selektif sumber karbon mikroorganisme penghasil selulase. Bakteri selulolitik akan menghidrolisis CMC, dengan ditandai adanya zona bening disekitar koloni (Hankin & Anagnostakis, 1977).

3) Medium Fermentasi

Medium fermentasi digunakan sebagai media biakan untuk pengujian waktu fermentasi optimal, pH optimal, suhu optimal, densitas bakteri optimal dan volume enzim optimal yang dihasilkan, untuk selanjutnya enzim selulase ekstrak kasar yang diperoleh, dilakukan pengujian aktivitas enzim (Shahid *et al.*, 2016).

3.5.5 Seleksi Bakteri Selulolitik pada Media CMC Agar

Isolat bakteri murni yang sudah tumbuh pada media agar miring NA, akan dilakukan seleksi bakteri selulolitik menggunakan media CMC agar. Media CMC terdiri dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 gr/100 mL, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 gr/100 mL, NaCl 0,23 gr/100 mL, *yeast extract* 0,2 gr/100 mL, CMC 1 gr/100 mL dan agar 2,5 gr/100 mL (Ji *et al.*, 2003). Penanaman bakteri pada media CMC menggunakan metode kertas cakram. Dilakukan

pembiakan dengan cara inokulasi 1 ose bakteri murni pada 25 mL media NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, 120 rpm (Mulyadi *et al.*, 2013). Bakteri yang telah dibiakan kemudian ditanam pada medium CMC agar yang berisi kertas cakram berdiameter ± 6 mm sebanyak 10 μ l (Niswah, 2014). Setelah bakteri ditanam pada media CMC agar, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan pada media CMC agar diwarnai dengan Congo red 0,1% dan diinkubasikan kembali selama 30 menit kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1% (Ji *et al.*, 2003). Seleksi bakteri selulolitik dilakukan berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media CMC. Nilai Indeks Selulolitik (IS) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$IS = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni bakteri}}$$

(Sinaga, 2013).

Tabel 3.1

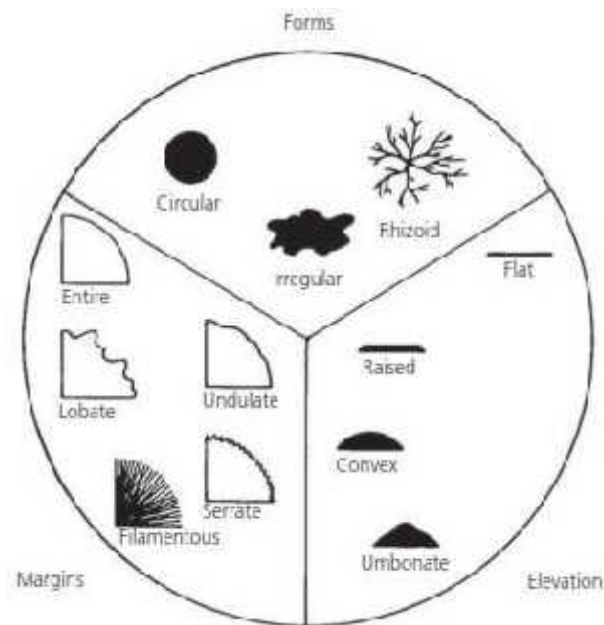
Instrumen Hasil Pengamatan Indeks Selulolitik Bakteri R4-3

Parameter yang diamati	Bakteri R4-3
Diameter Kertas Cakram	
Diameter Zona Bening	
<u>Indeks Selulolitik (IS)</u>	

3.5.6 Identifikasi Bakteri Selulolitik

1) Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi koloni dilakukan selama 7x24 jam masa inkubasi. Merujuk pada Cappuccino dan Sherman (2014), ciri yang diamati mulai dari ukuran, bentuk, warna, penampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), kepekatan koloni dan tepian (*margin*).



Gambar 3.1 Pengamatan morfologi bakteri

(Cappuccino & Sherman, 2014)

Tabel 3.2

Instrumen Hasil Pengamatan Koloni Bakteri R4-3

Morfologi Koloni	Bakteri R4-3
Bentuk	
Warna	
Elevasi	
Margin	

2) Pewarnaan Bakteri

Untuk mengetahui ciri-ciri fisiologis bakteri R4-3, dilakukan teknik pewarnaan yaitu pewarnaan sederhana, pewarnaan gram, pewarnaan kapsul dan pewarnaan endospora (Cappuccino & Sherman, 2014).

Tabel 3.3

Istrumen Hasil Pengamatan Pewarnaan Bakteri

Jenis Pewarnaan	Bakteri R4-3
Pewarnaan Gram	
Pewarnaan Kapsul	
Pewarnaan Endospora	

a. Pewarnaan Gram

Langkah melakukan pewarnaan gram dengan membuat olesan tipis dari suspensi isolat bakteri berumur 24 jam, dilakukan fiksasi panas dengan cara melewatkan bagian bawah gelas objek diatas api bunsen. Pewarna yang digunakan adalah larutan kristal violet selama 3 menit, kemudian kelebihan warna dibuang dan ditetesi larutan lugol selama 45-60 detik. Setelah ditetaskan larutan lugol, kemudian dibilas menggunakan alkohol 96% selama 1 menit dan dibilas dengan air menggunakan botol semprot. Langkah berikutnya ditetesi dengan safranin selama 3 menit. Kemudian dibilas dengan air dari botol semprot dan dikeringkan. Hasil pewarnaan di amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Sel bakteri Gram positif akan berwarna ungu sedangkan sel bakteri Gram negatif akan berwarna merah (*et al.*, 2016).

b. Pewarnaan Kapsul

Dalam pewarnaan kapsul terdapat dua jenis pewarna yaitu metode pewarnaan negatif dengan nigrosin dimana pewarna tersebut mewarnai latar dari gelas objek dan metode pewarnaan positif menggunakan kristal violet yang mewarnai dinding sel bakteri. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah membuat apusan bakteri tanpa difiksasi panas. Apusan bakteri tersebut ditetesi dengan kristal violet selama 5-7 menit, kemudian kelebihan warna dicuci dengan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20% dan dikeringkan. Apusan bakteri diamati dengan mikroskop 1000x (Aryal, 2018).

c. Pewarnaan Endospora

Untuk mengetahui spora pada bakteri, hal pertama yang harus dilakukan adalah membuat fiksasi biakan murni, setelah itu digenangi dengan *malachite green* 5%. Setelah diwarnai dengan *malachite green* 5%, apusan bakteri diuapkan selama 5 menit diatas penangas air kemudian dibersihkan dengan air mengalir. Olesan bakteri ditetesi oleh safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Menggunakan

perbesaran 1000x dapat diketahui warna spora adalah hijau (Hamdiyati & Kusnadi, 2018).

3) Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan untuk mendapatkan karakteristik bakteri R4-3. Berikut ini uji biokimia yang akan dilakukan adalah uji hidrolisis (pati, lipid, kasein, gelatin), uji fermentasi karbohidrat (sukrosa, laktosa, glukosa, dekstrosa), reaksi susu litmus, produksi H₂S, reaksi katalase dan tes IMViC (indol, Methyl red, Voges-Proskauer dan Sitrat) (Cappucino & Sherman, 2014).

Tabel 3.4
Instrumen Hasil Pengamatan Uji Biokimia

Karakteristik Uji Biokimia	Bakteri R4-3
Sukrosa	
Dekstrosa	
Laktosa	
<u>Uji Lainnya</u>	

a. Uji Hidrolisis

Terdapat beberapa uji hidrolisis seperti hidrolisis pati, lipid, gelatin dan kasein. Dalam hidrolisis pati, digunakan medium agar pati dimana bakteri yang mampu menghidrolisis pati ditunjukkan dengan terbentuknya daerah zona bening disekitar koloni setelah ditetesi dengan lugol, hasil positif menandakan bakteri memiliki enzim amylase untuk memecah pati. Pati dapat dihidrolisis oleh mikroorganisme tertentu dengan hasil akhir dekstrin. Medium yang digunakan pada hidrolisis pati adalah medium agar pati dimana bakteri diinokulasikan pada medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappucino & Sherman, 2014).

Hidrolisis lipid menggunakan medium lipid agar dengan hasil positif ditunjukkan dengan terdapat zona bening di sekitar koloni dan terdapat perubahan medium lipid menjadi warna merah pada bagian bawah koloni bakteri. Perubahan warna tersebut diakibatkan oleh terbentuknya

asam lemak yang mengakibatkan pH medium menurun. Medium agar lipid diinokulasikan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappucino & Sherman, 2014).

Hidrolisis gelatin menggunakan medium nutrient gelatin dimana mikroorganisme yang mampu menghidrolisis gelatin memiliki eksoenzim proteolitik yang disebut gelatinase. Hasil positif ditunjukkan oleh gelatin yang akan tetap cair setelah diinkubasi oleh bakteri meskipun disimpan pada suhu 4°C. Cara pengujiannya dengan melakukan inokulasikan bakteri pada medium gelatin dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 4°C selama 30 menit (Cappucino & Sherman, 2014).

Dalam uji hidrolisis kasein digunakan medium ssu skim agar dimana diinokulasikan bakteri pada medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji hidrolisis kasein positif dengan ditandai adanya zona bening disekitar koloni (Cappucino & Sherman, 2014).

b. Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolate bakteri dalam memfermentasi karbohidrat. Penelitian ini menggunakan 4 jenis gula yaitu glukosa, laktosa, dekstrosa dan sukrosa. *Brom cresol purple* (BCP) ditambahkan sebagai indikator. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan isolate bakteri ke dalam medium kemudian diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna pada medium menjadi kuning dan adanya gas/gelembung pada tabung durham (Cappucino & Sherman, 2014).

c. Tes Susu Litmus

Medium susu litmus memiliki protein kasein, gula laktosa, vitamin dan mineral. Tujuan dari tes ini untuk mengetahui komplemen enzim pada bakteri. Langkah yang harus dilakukan untuk memulai uji ini adalah menginokulasi bakteri pada *broth* medium dan diinkubasi selama

37°C, hasil positif ditandai dengan perubahan warna pada medium (Aryal, 2018).

d. Uji Reaksi Katalase

Uji reaksi katalase dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada medium *nutrient agar* dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil kultur bakteri pada *nutrient agar* tersebut ditetaskan larutan H₂O₂ 23% pada permukaan koloni. Hasil positif ditunjukkan oleh adanya gelembung yang terbetuk setelah ditetesi H₂O₂ maka organisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappucino & Sherman, 2014).

e. IMVIC

IMVIC merupakan singkatan dari (*Indole*, *Methyl red*, *Voges-Proskauer* dan *Citrat*). Pengujian indole dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri membentuk indol dari degradasi asam amino tryptophan. Media yang digunakan adalah *trypton broth*, kemudian diinokulasikan bakteri pada medium tersebut lalu diinkubasi selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah muda pada permukaan *broth* setelah ditetesi reagen Kovac's pada kultur *broth* tersebut. Terbentuknya warna merah muda pada permukaan *broth* dikarenakan indol yang dihasilkan bakteri bereaksi dengan para-dimetilaminobenzaldehid (p-dimetilaminobenzaldehid) yang terkandung pada reagen Kovac's (Cappucino & Sherman, 2014).

Tujuan dari uji *methyl red* adalah untuk menentukan perubahan glukosa menjadi produk asam laktat, asam asetat atau asam format. Uji *methyl red* dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada MR *broth* kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam, biakan ditetesi dengan *methyl red* pada masing-masing tabung reaksi, hasil positif ditunjukkan dengan warna merah muda pada *broth*, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan warna kuning (Cappucino & Sherman, 2014).

Tujuan dari uji Voges-Proskauer (VP) adalah untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi asetil metil karbinol. Uji VP

dilakukan dengan menginokulasi bakteri ke dalam media VP *broth* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah proses inkubasi, biakan ditetesi dengan 5 tetes reagen VP B (yang mengandung KOH), kemudian dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan oleh adanya perubahan menjadi warna merah muda atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Hasil negatif ditunjukkan oleh tidak berubahnya warna media atau menjadi warna tembaga (Cappucino & Sherman, 2014).

Uji sitrat dilakukan dengan menggunakan media Simmons *citrate agar*. Uji sitrat bertujuan untuk menguji kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan sitrat sebagai sumber energi. Bakteri yang dapat tumbuh pada media Simmons's *Citrate* memproduksi enzim sitrat-permease yang dapat mengubah sitrat menjadi piruvat. Piruvat dapat masuk ke dalam siklus metabolisme untuk menghasilkan energi (Aryal, 2018). Hasil positif apabila media berubah warna dari hijau ke biru, hal tersebut dikarenakan peningkatan alkalinitas karena bakteri memetabolisme sitrat sehingga garam ammonium terhidrolisis menjadi ammonia. Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose bakteri pada media Simmons *citrate agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Aryal, 2018).

f. Uji produksi H₂S

Untuk mengetahui produksi H₂S, media SIM agar (*sulfide, indole, motility*) agar diinokulasikan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi hitam (Aryal, 2018).

g. Kebutuhan oksigen

Tidak semua mikroorganisme memerlukan oksigen, namun ada beberapa kelompok. Berikut ini merupakan jenis-jenis kebutuhan oksigen bakteri, yaitu aerob (memerlukan oksigen sebagai akseptor elektron dalam proses respirasi), anaerob merupakan organisme yang tidak memerlukan oksigen, dimana oksigen dapat mereduksi H₂O₂

yang bersifat toksik bagi bakteri. Fakultatif aerob merupakan bakteri yang dapat tumbuh dalam lingkungan kelompok anaerob dan mikroorganisme aerofilik merupakan mikroorganisme yang memerlukan oksigen dalam jumlah terbatas sebab jumlah yang berlebihan akan menghambat enzim oksidatif. Uji kebutuhan oksigen dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada medium *nutrient agar*, kemudian tutup medium dilapisi paraffin agar tidak ada udara yang masuk (Hamdiyati & Kusnadi, 2018).

h. Motilitas

Untuk melakukan uji motilitas, medium *nutrient agar* diinokulasikan bakteri dengan cara di stab kemudian diamati pertumbuhannya. Apabila bakteri bersifat motil maka, terdapat pertumbuhan disekitar bakteri yang diinokulasi dan medium berubah warna menjadi keruh (Cappucino & Sherman, 2014)..

3.5.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri R4-3

Untuk mengetahui umur dan fase pertumbuhan biakan, dilakukan kurva pertumbuhan bakteri. Sebanyak 1 ose bakteri R4-3 diinokulasikan kedalam 25 mL medium NB, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan kecepatan 120 pm. Kepadatan sel atau *Optical Density* (OD) diukur dengan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 60 menit (Wahyuningsih & Zulaika, 2018).

3.5.8 Pre-treatment Jerami Padi dan Delignifikasi

Jerami padi yang diperoleh 2 hari setelah pasca panen dari persawahan di jalan Sawah Lega III Cipageran, Kota Cimahi, dilakukan tahap pencucian, pemotongan dan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 70°C selama 3 hari hingga berat jerami konstan (Nata *et al.*, 2014). Jerami yang sudah kering diblender dan disaring dengan ukuran 100 mesh. Setelah didapatkan serbuk jerami padi berukuran 100 mesh, kemudian dilakukan tahap delignifikasi menggunakan 0,5 M KOH selama

4 jam di suhu ruang dan 0,1 H₂SO₄ selama 1 jam di suhu ruang dengan masing-masing rasio perendaman 1:10. Kemudian jerami hasil *pre-treatment* dicuci dengan air hingga pH netral dan disterilisasi dengan otoklaf pada 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit (Goyal *et al.*, 2014).

3.5.9 Produksi Enzim Secara Submerged Fermentation (SmF)

Sebelum dilakukan tahapan produksi enzim secara SmF, 1 ose bakteri R4-3 diinokulasikan pada 25 mL NB dalam 250 mL labu Erlemenyer yang telah disterilisasi dengan suhu 121°C, 15 psi selama 20 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 120 rpm selama 24 jam (Shahid *et al.*, 2014).

Langkah produksi enzim secara SmF diperlukan 25 mL medium fermentasi (*yeast extract* 1 gr, sukrosa 2 gr, K₂HPO₄ 1 gr dan FeSO₄ 0,01 gr/l) mengandung 0,5 mL *basal salt solution* (NaNO₃ 10 gr, KCl 2,5 gr, MgSO₄ 2,5 gr dan air distilasi 50 mL) (Kumar *et al.*, 2009). Ditambahkan 2% (w/v) jerami yang telah *ditreatment*, semua bahan dimasukkan kedalam tabung 100 mL dan disterilisasi menggunakan otoklaf dengan suhu 121°C, 15 psi selama 15 menit. Setelah disterilisasi, labu Erlemenyer yang berisi medium fermentasi didinginkan pada suhu ruang dan sebanyak 1% inokulum kultur murni bakteri R4-3 pada densitas bakteri 10⁶ CFU/mL diinokulasikan pada medium fermentasi. Setelah inokulasi, medium fermentasi diinkubasi pada suhu 36,5°C dan 37,5 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm, selama 0, 24, 48, 72, 96, 120 jam (Sreedevi *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2016; Phong *et al.*, 2017).

Setiap 0, 24, 48, 72, 96, 120 jam waktu fermentasi, media fermentasi disaring dengan kertas saring, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C. Setelah proses sentrifugasi akan didapatkan enzim ekstrak kasar berupa partikel bening (supernatant) (Sholihati *et al.*, 2015).

3.5.10 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Dalam pembuatan standar glukosa, konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi glukosa 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 ppm. Dilakukan pembuatan larutan stok glukosa dengan konsentrasi 1000 ppm yaitu, dengan melarutkan sebanyak 0,05 gram glukosa dengan 50 mL akuades. Larutan stok dengan konsentrasi glukosa 1000 ppm kemudian dilarutkan menjadi konsentrasi yang diinginkan (Rosyada, 2015).

3.5.11 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pada penelitian ini dibuat larutan standar glukosa dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 ppm. Dari masing-masing konsentrasi, diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan vorteks. Tabung reaksi yang berisi glukosa dan reagen DNS dididihkan selama 5-15 menit hingga larutan berwarna merah-coklat. Sebanyak 1 mL KNa-tartrat ditambahkan dan didinginkan. Aquades ditambahkan hingga volume menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Dengan menggunakan spektrofotometer, absorbansi tiap konsentrasi glukosa diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Setelah didapatkan kurva standar glukosa, untuk mengetahui konsentrasi glukosa dari sampel digunakan persamaan garis $y = ax + b$ (Rosyada, 2015).

3.5.12 Pengukuran Parameter

1) Biomassa bakteri R4-3

Untuk mengetahui jumlah bakteri pada saat proses fermentasi dilakukan teknik perhitungan *Optical Density* (OD). Sebanyak 1 mL medium fermentasi dari masing-masing sampel dimasukkan kedalam kuvet dengan aquades sebagai blanko, kemudian diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm (Lizayana *et al.*, 2016).

2) Uji Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas enzim selulase diukur dengan mereaksikan 0,5 mL CMC 1% (disiapkan dalam 0,05 M buffer sitrat pH 5) dan 0,5 mL larutan enzim, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan 1,5 mL larutan DNS untuk menghentikan reaksi dan dididihkan selama 10 menit pada *waterbath*. Setelah sampel dingin dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer. Jumlah gula yang dihasilkan ditentukan dengan standar glukosa. Satu unit aktivitas selulosa didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diproduksi 1 μ mol glukosa per menit (Ghosh, 1987). Berikut ini rumus menentukan aktivitas enzim selulase (Aryani, 2012).

$$\text{Aktivitas Selulase (U/mL)} = \frac{\text{Konsentrasi Gula Pereduksi} \times \text{Fp} \times 10}{t \times \text{BM Glukosa}}$$

Keterangan :

FP = Faktor pengenceran

t = Waktu inkubasi (30 menit)

BM = BM glukosa (180 dalton)

Tabel 3.5
Instrumen Pengukuran Biomassa Bakteri dan Aktivitas Enzim

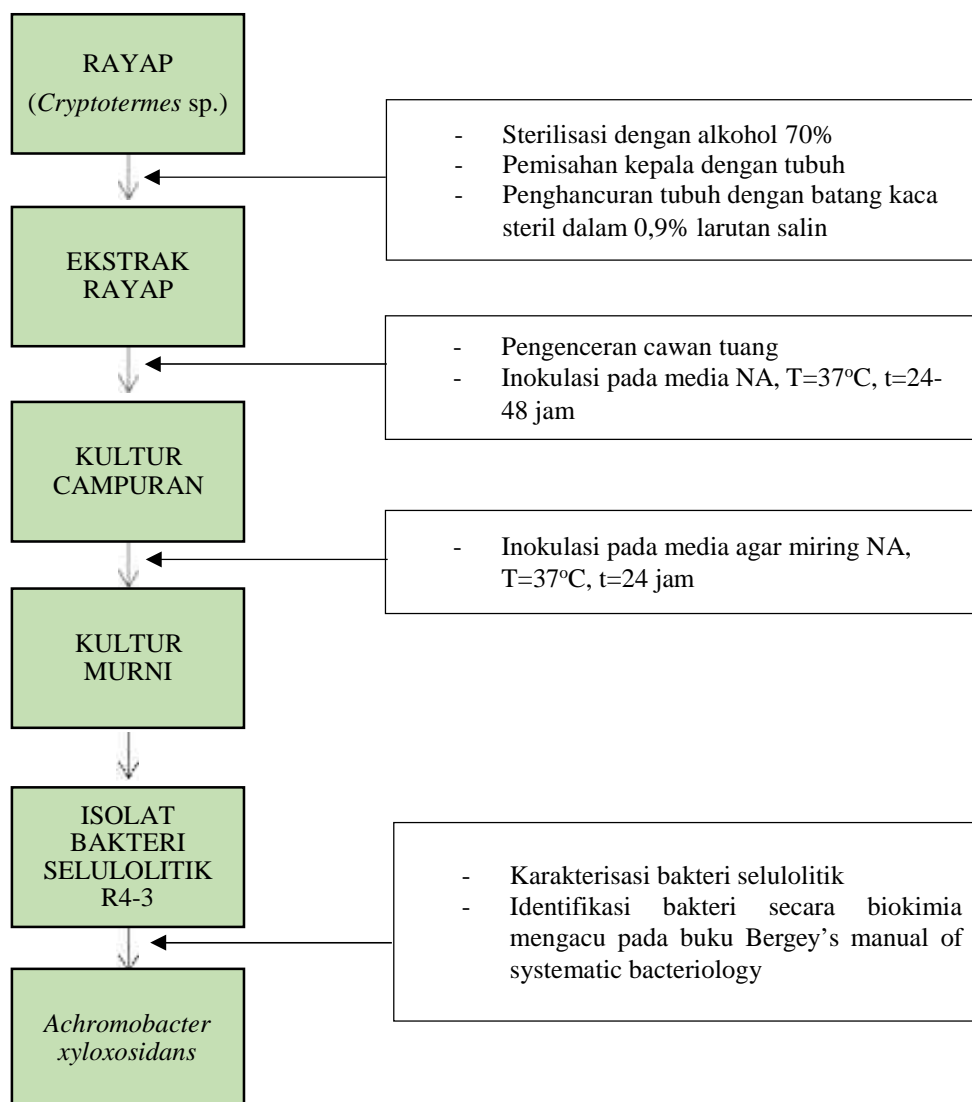
Waktu Pengambilan Sampel	36,5°C / 37,5°C					
	pH 6,5			pH 7,5		
	Biomassa Bakteri R4-3	Konsentrasi Gula Pereduksi (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Biomassa Bakteri R4-3	Konsentrasi Gula Pereduksi (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)
0 Jam						
24 Jam						
48 Jam						
72 Jam						
96 Jam						
120 Jam						

3.7 Analisis Uji Statistik

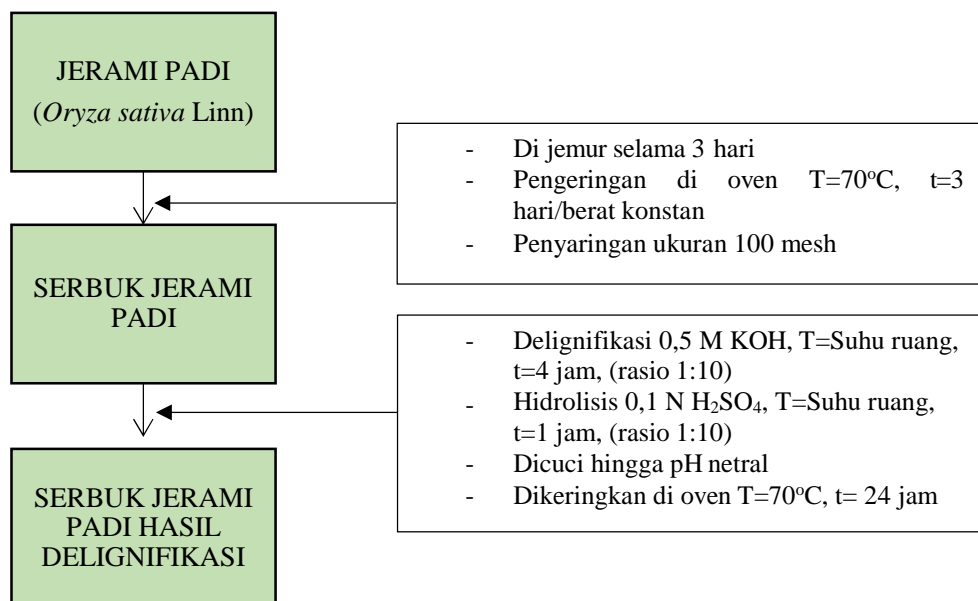
Analisis data digunakan program SPSS 25 *for Windows*: Pertama dilakukan tahap uji normalitas kemudian dilakukan uji homogenitas. Jika data yang diperoleh normal dan homogen dilakukan uji *Two Way ANOVA*

(*Analysis of Variance*), dan jika data tidak homogen dilakukan uji non parametric yaitu uji Mann-Whitney.

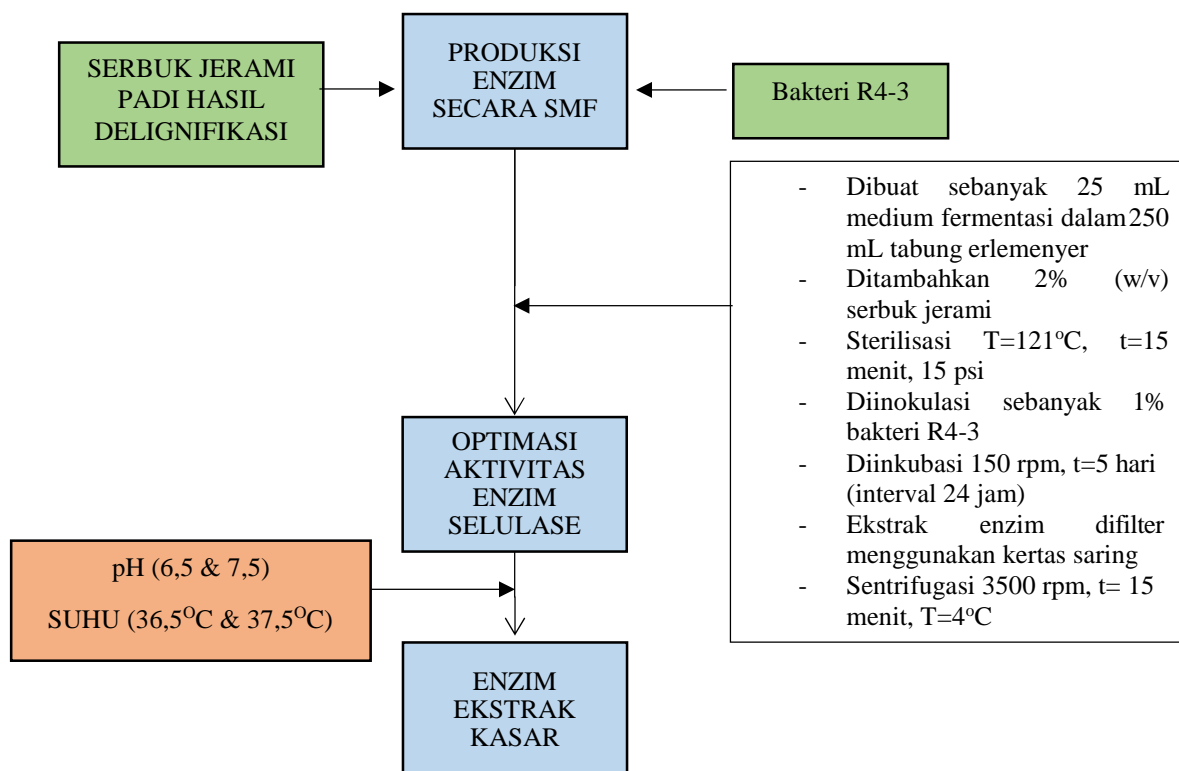
3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian isolasi bakteri selulolitik R4-3 dari saluran pencernaan rayap (*Cryptotermes* sp.)



Gambar 3.3 Alur penelitian *pre-treatment* jerami padi (*Oryza sativa*, Linn)



Gambar 3.4 Alur penelitian produksi enzim selulase secara SmF menggunakan media serbuk jerami padi (*Oryza sativa*, Linn)